



②① Aktenzeichen: 199 30 532.3  
②② Anmeldetag: 30. 6. 1999  
④③ Offenlegungstag: 11. 1. 2001

DE 199 30 532 A 1

⑦① Anmelder:  
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

⑦② Erfinder:  
Wolleschensky, Ralf, 99510 Apolda, DE; Feurer,  
Thomas, Dr., 07743 Jena, DE; Sauerbrey, Roland,  
Prof., 07743 Jena, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
zu ziehende Druckschriften:

DE 43 30 347 C2  
DE 42 21 063 C2  
DE 39 15 421 C2

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- ⑤④ Anordnung zur Optimierung der Pulsform in einem Laser-Scanning-Mikroskop
- ⑤⑦ Vorrichtung zur Einkopplung eines KurzpulsLasers in einen mikroskopischen Strahlengang, wobei die spektralen Komponenten der Laserstrahlung mit Hilfe eines dispersiven Elementes räumlich separiert, die einzelnen spektralen Komponenten manipuliert und anschließend wieder mit Hilfe eines weiteren dispersiven Elementes räumlich überlagert werden.

DE 199 30 532 A 1

In der Mikroskopie zur Untersuchung von z. B. biologischen Präparaten werden heutzutage immer häufiger nichtlineare Kontraste, wie die Zwei-Photonen Absorption oder die Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) eingesetzt. Um die zur Anregung von nichtlinearen Effekten nötige Energie bereitzustellen, ist es vorteilhaft Kurzpuls laser einzusetzen. Dabei sollte die Pulsspitzenleistung möglichst groß und damit die Pulslänge am Ort der Probe möglichst klein sein, um eine gleichzeitige Schädigung der Präparate zu verhindern. Kurzpuls laser liefern beispielsweise Lichtimpulse mit einer Pulslänge von einigen 10 fs bei einer Repetitionsrate von mehreren 10 MHz. Sie haben dadurch den Vorteil äußerst hohe Pulsspitzenenergien bei gleichzeitig geringer mittlerer Leistung zu emittieren.

Nachteilig ist, daß sich die kurzen Pulse auf dem Weg durch das Mikroskop zur Probe durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) verändern – im Normalfall werden sie länger.

Zur Kompensation der Pulsverlängerung wurden entsprechende Anordnungen (Prechirp-Einrichtungen) vorgeschlagen (DE 196 22 353).

In DE 197 33 193 sind weiterhin apaptive Optiken vorgesehen.

Die beschriebenen Vorrichtungen sind zur Kompensation der Dispersion 2. Ordnung geeignet.

In den z. B. biologischen Präparaten ist jedoch mit nicht vorher bestimmbarer Dispersionen höherer Ordnungen zu rechnen. Weiterhin treten in den optischen Komponenten in einem Mikroskop Dispersionen höherer Ordnung auf. Somit ist es mit den herkömmlichen Techniken nicht möglich, optimale Bedingungen zur Anregung der nichtlinearen Kontraste schaffen.

In konventionellen Fluoreszenzmikroskopie werden verschiedene Farbstoffe zur spezifischen Markierung von biologischen Präparaten eingesetzt. Diese Farbstoffe werden anschließend mit unterschiedlichen Lichtwellenlängen angeregt. Durch den Einsatz der Multiphotonen-Anregung erfolgt bei solchen Präparaten meist eine simultane Anregung der verschiedenen Farbstoffe. Dies ist einerseits ein Vorteil, da man nur noch eine Lichtwellenlänge zur Anregung benötigt. Andererseits ist es von Nachteil, wenn sich die Emissionswellenlängenbänder der einzelnen Farbstoffe überlagern, da die Farbstoffe dann nicht mehr spektral getrennt werden können. Aufgabe der Erfindung ist die Beseitigung der beschriebenen Nachteile.

#### Anordnung

Ein Blockschaltbild des bevorzugten Aufbaus ist in Fig. 1 dargestellt.

Ausgehend vom Kurzpuls laser KL gelangen die Lichtimpulse in den Pulsformer PF. Dieser ist schematisch in Fig. 2a gezeigt. Im Pulsformer PF wird der einfallende Strahl beam in in einem ersten dispersiven Element (1) bestehend z. B. aus einem Gitter oder Prismen die spektralen Komponenten der Lichtpulse räumlich aufgespalten. Anschließend wird mit Hilfe einer achromatisch korrigierten Linse oder Linsengruppe L1 (Fig. 2) eine Fourierebene erzeugt.

Diese Ebene (Brennebene) zeichnet sich dadurch aus, daß hier die einzelnen Spektralanteile der Lichtpulse räumlich separiert sind. Die Transformation in diese Ebene entspricht mathematisch gesehen einer Fouriertransformation. In diese Ebene wird ein räumlicher Licht-Modulator (2) (spatial light modulator – SLM) in Transmission eingesetzt. Dieser besteht im allgemeinen aus einer Matrix von helixartig oder parallel angeordneten, nematischen Flüssigkeitskristallen

(z. B. SLM-S160/h, Firma: Jenoptik LOS). Durch eine entsprechende elektronische Beschaltung der einzelnen Punkte der Matrix kann die Transmission bzw. Phasenverschiebung der entsprechenden spektralen Komponente eingestellt werden. Anschließend wird die räumliche Trennung der spektralen Komponenten der Lichtpulse durch eine zweite identische Linse L2 und ein zweites dem ersten identisches dispersives Element (3) aufgehoben – beam out. Dieser Vorgang entspricht der Rücktransformation in den Zeitbereich. Mit Hilfe der Phasen- bzw. Amplitudenmodulation kann somit das zeitliche Verhalten der Lichtimpulse gesteuert werden. Die Anordnung aus 2 Gittern und 2 Linsen ist in der Literatur unter der Bezeichnung 4f – Anordnung bekannt.

Eine vereinfachte Anordnung für den Pulsformer ist in Fig. 2b aufgeführt. Hier ist gleich nach dem Modulator (2) ein Spiegel S angeordnet, so daß die Strahlung in sich zurück mit einem kleinen Höhenversatz oder unter einem kleinen Winkel in sich zurück läuft. Diese Anordnung kommt zum einen mit weniger optischen Komponenten aus, zum anderen durchlaufen die Lichtpulse hier zweimal den Modulator (2), so daß sich die Größe der Phasen-/Amplitudenmodulation verdoppelt.

In Fig. 3 ist die dispersive Aufspaltung und Zusammenführung eines roten Anteils r und eines blauen Anteils b unter Passieren des Manipulators 2 sowie der Wellenlängenverlauf entlang einer Richtung X auf dem Manipulator 2 schematisch dargestellt.

Nachdem im Pulsformer das zeitliche Verhalten verändert werden kann gelangen die Lichtpulse über entsprechende optische Komponenten über das Mikroskop M und das Objektiv O in die Probe P. In der Probe P wird aufgrund der starken Fokussierung durch das Objektiv und der hohen Pulsspitzenleistung der Lichtpulse ein nichtlinearer Effekt angeregt. Dieser wird vom Detektor (4) registriert. Somit steht ein entsprechendes Meßsignal zur Verfügung, daß durch die elektronische Ansteuerung des Pulsformers mittels der Regelung R optimiert werden kann.

Die Wirkungsweise der Regelung soll nun beispielhaft anhand der Erzeugung eines Zwei-Photonen-Fluoreszenzsignales beschrieben werden.

Das Zwei-Photonen-Fluoreszenzsignal (S) kann wie folgt beschrieben werden:

$$S \propto \frac{P_{avg}^2}{\tau^2 \cdot A^2}$$

wobei  $P_{avg}$  die mittlere Leistung und  $\tau$  die Pulslänge der Lichtpulse am Ort der Probe sind. A steht für den Strahlquerschnitt am Ort der Probenwechselwirkung.

Aus der obigen Gleichung ist ersichtlich, daß das Zwei-photonen-Fluoreszenzsignal mit kleiner werdender Pulslänge und Strahlquerschnitt und größer werdender mittlerer Leistung wächst. In einem Mikroskop wird die Pulslänge durch folgende Faktoren beeinflusst, d. h. meist verlängert:

- Durch die Glasmaterialien aus denen die optischen Elemente im Mikroskop gefertigt sind. Eine Kompensation kann hier stationär erfolgen.
- Durch das Präparat an sich. Die Pulsverlängerung ist hier abhängig von der Eindringtiefe in das Präparat. Weiterhin wird die Pulsverbreiterung durch Dispersionen höherer Ordnung erzeugt. Deshalb muß hier die Kompensation für jede spektrale Komponente einzeln und in Echtzeit erfolgen.
- Durch die Änderung der Wellenlänge
- Durch die Änderung der mittleren Leistung.

Der Pulsformer PF und damit das zeitliche Verhalten der

Lichtpulse wird deshalb in Abhängigkeit von den o. g. Größen durch die Regelung in Echtzeit eingestellt, wobei als Meßgröße das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal fungiert. Durch den Pulsformer wird im wesentlichen die Pulslänge und die mittlere Leistung am Ort der Probenwechselwirkung optimiert.

Weiterhin sind die Wechselwirkungsquerschnitte der verwendeten Farbstoffe abhängig von dem zeitlichen Verhalten der Lichtpulse. Somit ist es möglich das Fluoreszenzsignal für einzelne Farbstoffe zu optimieren, wobei die Fluoreszenz anderer Farbstoffe gleichzeitig unterdrückt wird. Dies ist in der Literatur unter dem Begriff der kohärenten Kontrolle bekannt. Man hat also die Möglichkeit durch die Rückkopplung der Meßgröße (hier das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal) das zeitliche Verhalten der Lichtpulse durch Phasen- oder Amplitudenmodulation so einzustellen, daß die entsprechende Meßgröße optimiert wird.

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Einkopplung eines Kurzpulslasers in einen mikroskopischen Strahlengang, wobei die spektralen Komponenten der Laserstrahlung mit Hilfe eines dispersiven Elementes (1) räumlich separiert, die einzelnen spektralen Komponenten manipuliert und anschließend wieder mit Hilfe eines weiteren dispersiven Elementes (3) räumlich überlagert werden.
2. Vorrichtung zur Einkopplung eines Kurzpulslasers in einen mikroskopischen Strahlengang nach Anspruch 1, wobei die spektralen Komponenten der Laserstrahlung mit Hilfe eines dispersiven Elementes (1) räumlich separiert, in der Fourierebene/Brennebene eines Abbildungselements Komponenten manipuliert (Manipulator 2) und anschließend wieder mit Hilfe eines weiteren dispersiven Elementes (3) räumlich überlagert werden.
3. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die spektralen Komponenten nach der Manipulation (2) an einem Spiegel reflektiert werden und mit Hilfe des dispersiven Elementes (1) wieder überlagert werden.
4. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Mikroskop ein Laser-Scanning Mikroskop ist.
5. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Mikroskop zur Untersuchung von nichtlinearen Kontrastverfahren eingesetzt wird.
6. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei als dispersives Element Prismen oder Gittern eingesetzt werden.
7. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Manipulator (2) eine Amplitudenmodulation der spektralen Komponenten erzeugt.
8. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Manipulator (2) eine Phasenmodulation der spektralen Komponenten erzeugt.
9. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Vorrichtung zur Einkopplung eines Kurzpulslasers eine Monomode-Faser F nachgeschaltet ist.
10. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Monomode-Faser auch polarisationserhaltend wirkt.
11. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei als Manipulator (2) ein

räumlicher Lichtmodulator (spatial light modulator - SLM) in der Fourierebene verwendet wird.

12. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch Rückkopplung des Meßsignals (4) der Manipulator (2) gezielt optimiert und damit das gewünschte Meßsignal eingestellt wird.

13. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) zur Kompensation der Dispersion höherer Ordnung eingesetzt wird.

14. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von der Mittenwellenlänge des Kurzpulslasers (6) optimiert wird.

15. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von dem verwendeten Objektiv optimiert wird.

16. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von der verwendeten mittleren Leistung optimiert wird.

17. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von der Eindringtiefe (5) in ein zu untersuchendes Präparat eingestellt und damit ein nichtlinear angeregtes Fluoreszenzsignal optimiert wird.

18. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mit Hilfe eines adaptiven Elementes AO zusätzlich die Pulsfront und die sphärischen Aberrationen optimiert werden.

19. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von dem verwendeten Objektiv optimiert wird.

20. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels Phasen- und Amplitudenmodulation im Modulator (2) ein gezieltes Anregen von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt.

21. Vorrichtung nach 19, wobei dies selektiv erfolgt.

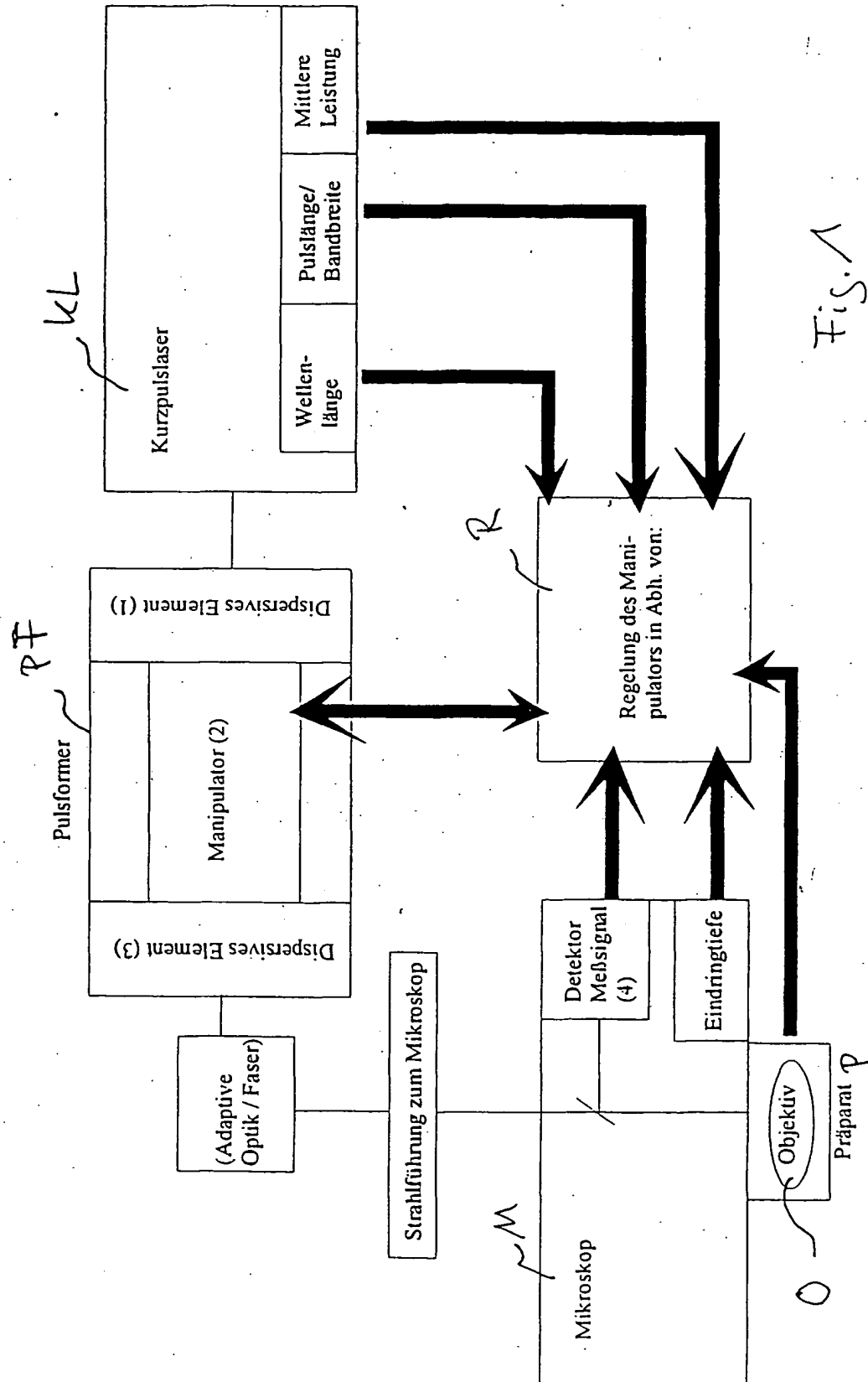
22. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels Phasen- und Amplitudenmodulation im Modulator (2) ein gezieltes Auslösen von Reaktionen (FRET, Uncaging) in Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt.

23. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels Phasen- und Amplitudenmodulation im Modulator (2) ein gezieltes Bleichen von Farbstoffen erfolgt.

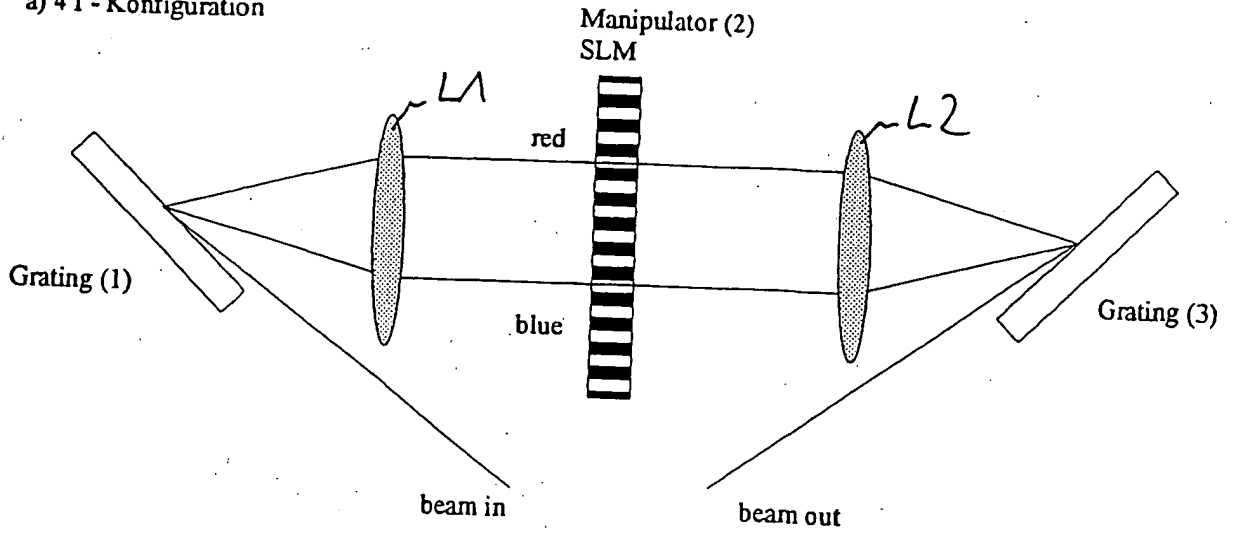
---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---



a) 4 f - Konfiguration



b) gefaltete 4 f - Konfiguration

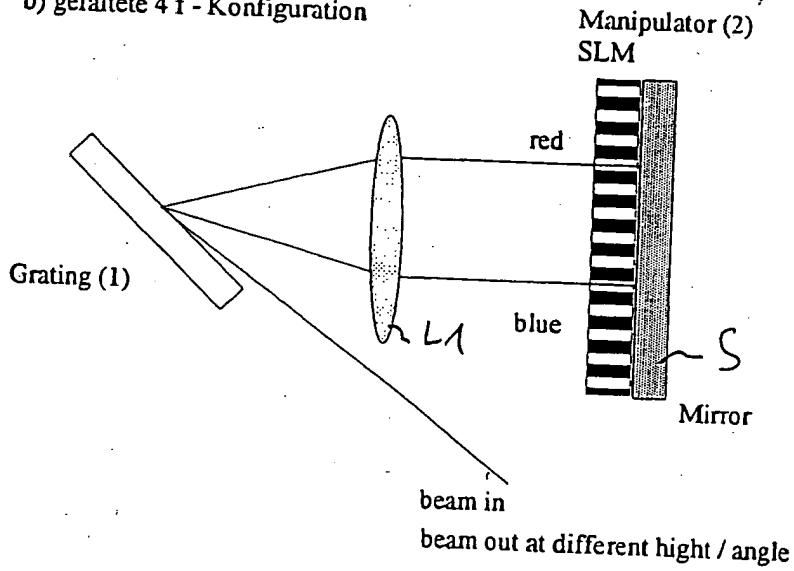


Fig. 2

a) 4 f - Konfiguration

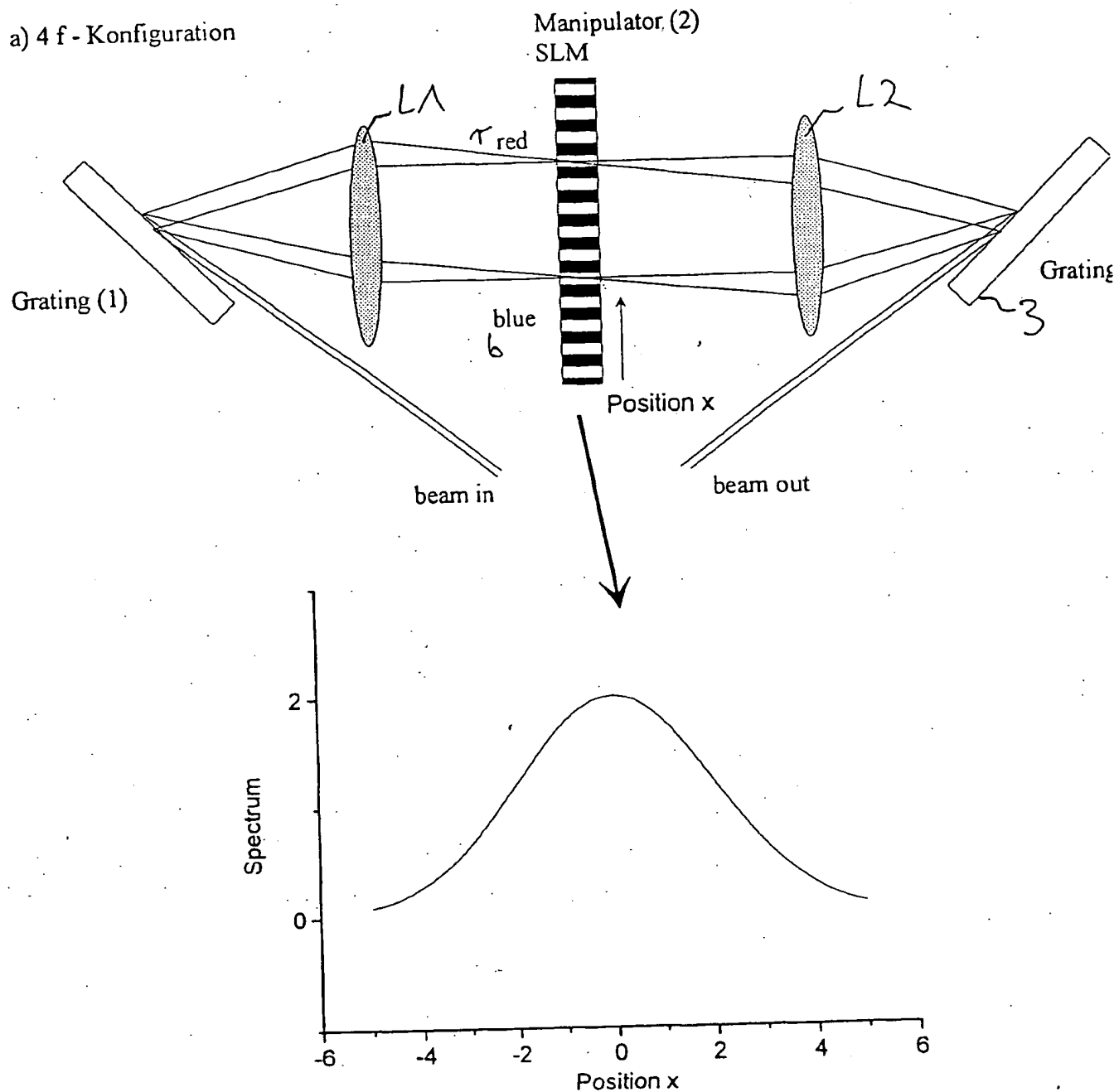


Fig. 3